

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人 日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 31 年度

受付番号 201960781

氏 名 松原 康平

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地（派遣先国名）用務地： ミシガン大学（国名： 米国）
2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。
食事性アミノ酸による腸管粘液バリア制御機構の解明
3. 派遣期間：平成 31 年 4 月 1 日 ～ 令和 1 年 6 月 30 日
4. 受入機関名及び部局名
Department of Internal Medicine, University of Michigan
5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も可)**
(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)
(注)「6. 研究発表」以降については様式 10－別紙 1～4 に記入の上、併せて提出すること。

5. 所期の目的の遂行状況及び成果

■研究背景・研究目的

炎症性腸疾患（Inflammatory bowel disease; IBD）は原因不明の難治性疾患であり、主に潰瘍性大腸炎とクローン病に分けられる。IBD の原因は未だ明らかにされていないが、日本では近年急速に IBD 患者が増加していることから、遺伝因子より食事などの環境要因が大きいことが示唆されている。これまでの研究により様々な食事成分が IBD の病態に影響することが報告されているが、その詳細なメカニズムは明らかにされておらず、IBD における食事療法を確立するうえでの課題となっている。

近年、IBD の治療法の一つとしてアミノ酸を用いた栄養療法の重要性が再認識されている（Sugihara et al. *Front Immunol.* 2018）。腸炎環境下では、通常とは異なるアミノ酸代謝経路を活性あるいは抑制することによって、その環境に適した代謝を制御する。IBD では全身あるいは局所的なアミノ酸代謝異常が生じるため、食事から特定のアミノ酸を補給によることにより炎症を抑制できることが様々な研究により明らかにされている（Abigail et al. *Front Immunol.* 2016）。アミノ酸は宿主の細胞にとって大切な栄養素である一方、腸内に存在する細菌にとっても重要な栄養素である。腸内細菌によるアミノ酸の代謝物が腸管免疫を制御することも報告されており、アミノ酸-腸内細菌の相互作用が注目されている。しかしながら、代謝変動が生じる炎症環境下におけるアミノ酸-腸内細菌の相互作用は不明な点が多く、IBD における栄養療法を開発するうえで重要課題となっている。本研究では、腸炎環境下におけるアミノ酸と腸内細菌の相互作用を解明し、IBD に対するアミノ酸を用いた栄養療法の科学的基盤を確立することを目的に以下の研究を行った。

■研究の実施状況および成果

まず腸炎環境下における腸内のアミノ酸の代謝変動を評価するために、NIH の Human Microbiome Project で公表されている IBD の Multi'omics Database から、IBD 患者の腸内細菌のオミクスデータを解析した。Multi'omics Database では、nonIBD 患者と潰瘍性大腸炎患者、クローン病患者由来の糞便のメタゲノム解析、メタトランスクリプトーム解析、メタボローム解析結果が公開されており、これらのデータを解析して IBD 患者の腸内細菌および腸内環境におけるアミノ酸合成経路の変動を評価した。これらの解析結果を図 1 に示した。メタゲノム解析およびメタトランスクリプトーム解析の結果より、セリンおよびグリシン合成経路の機能が、nonIBD 患者に比べ潰瘍性大腸炎患者およびクローン病患者で有意に低下していた（図 1A、1B）。また、メタボローム解析の結果では、グリシン濃度は nonIBD 患者と IBD 患者で有意な差は見られなかったが、セリン濃度は潰瘍性大腸炎およびクローン病患者で著しく低下していた（図 1C）。これらの解析結果から、IBD 患者の腸内環境ではセリンが低下しており、炎症下における腸内環境を制御するうえでセリンが何か重要な役割を果たしていることが示唆された。

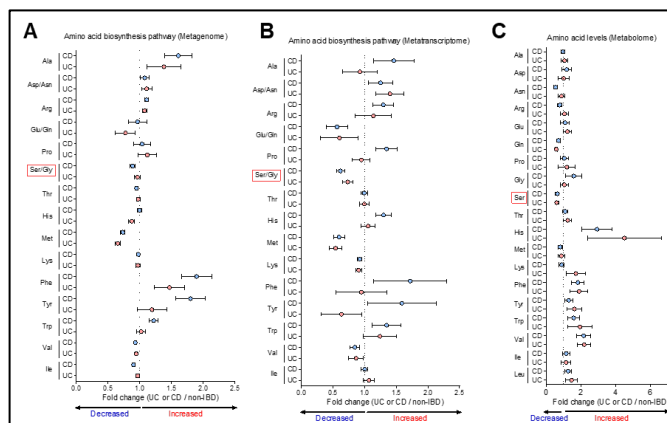
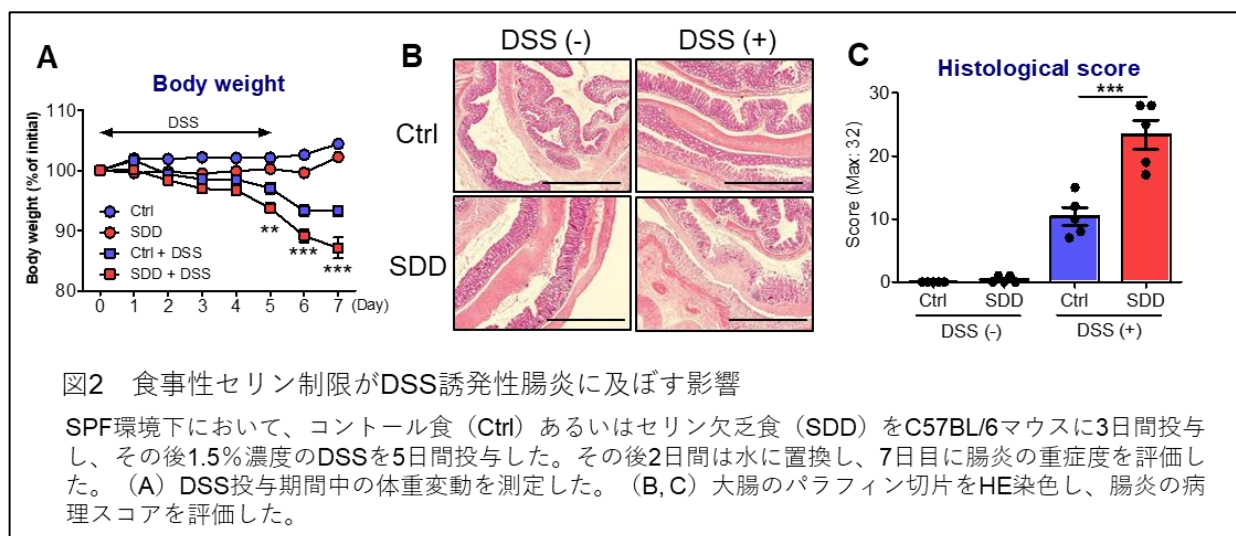


図1 オミクス解析によるIBD患者のアミノ酸代謝プロファイル
NIHのHuman Microbiome Projectで公表されているIBDのMulti'omics Databaseから、IBD患者の糞便のオミクスデータを解析した。(A)メタゲノム解析、(B)メタトランスクリプトーム解析によるアミノ酸合成経路の結果をnonIBD患者に対する比率で示した。(C)メタボローム解析による糞便中のアミノ酸濃度をnonIBD患者に対する比率で示した。

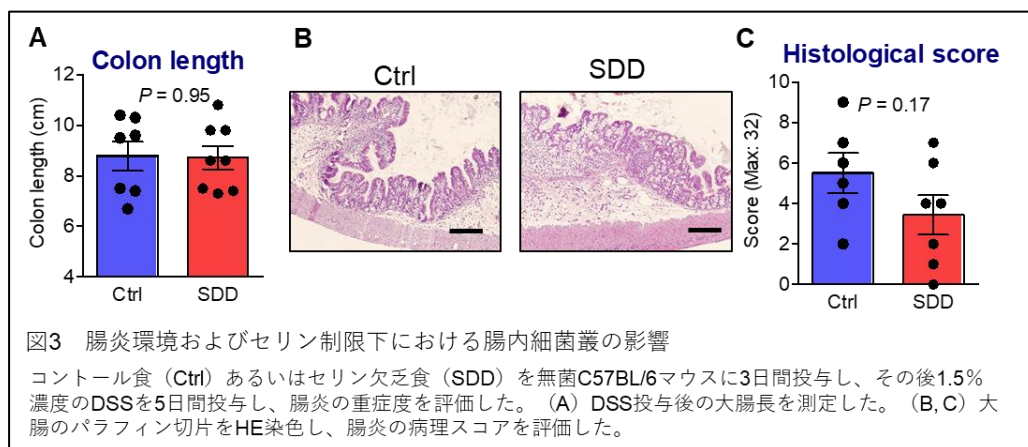
セリンは非必須のアミノ酸の一つであり、one-carbon metabolism に関与することから、その機能が注目されている。例えば、癌細胞や活性化 T 細胞ではセリン代謝が亢進しており、セリンが細胞の増殖や生存が明らかにされている (Maddocks et al. Nature. 2017, Ma et al. Cell Metab. 2017)。また、受入研究者である鎌田博士らは、クローン病患者由来の特定の大腸菌が、炎症環境下でセリン代謝を亢進させていることを明らかにした (Kitamoto et al. Nat Microbiol. accepted)。さらに鎌田博士らは、腸管腔内のセリン濃度は主に食事によって制御されており、食事性セリンが大腸菌の競合制御に重要であることを解明した。これらの背景から、炎症環境下では宿主細胞および腸内細菌ともにセリンが重要な栄養素であることが考えられた。

図 1 に示した通り、IBD 患者では腸内細菌によるセリン合成および糞便中のセリン濃度が低下していることが示された。近年のメタゲノム解析では、健常者に比べ IBD 患者ではアミノ酸合成が低下、アミノ酸のトランスポーターが増加しており、腸内細菌は管腔内のアミノ酸を栄養源として利用していることが報告された (Morgan et al. Genome Biol. 2012)。これらの報告から、IBD のような腸炎環境下では、腸内細菌が管腔内のセリンを積極的に取り込み、その結果管腔内のセリン濃度が低下している可能性が示唆された。しかしながら、腸炎環境下におけるセリンの役割は不明な点が多く、特に IBD の病態に与える影響は未だ明らかにされていない。

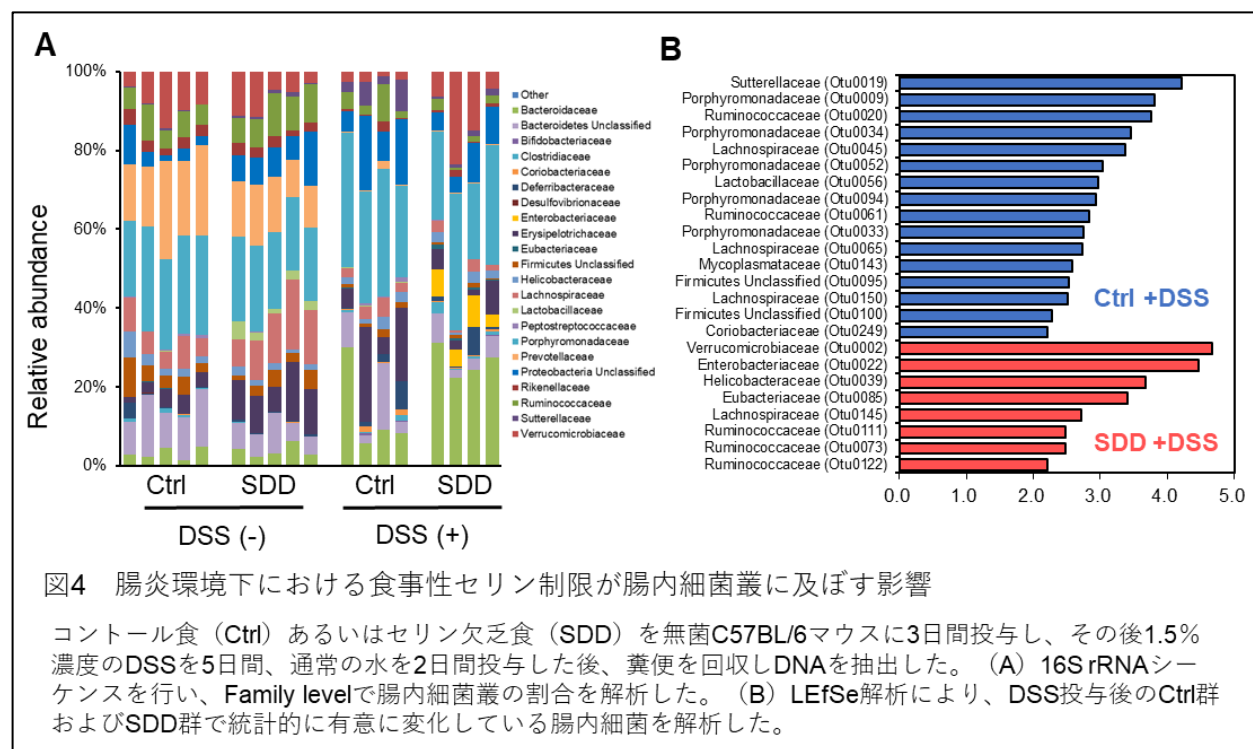
そこで、腸炎モデルマウスにセリン欠乏食を投与することにより、炎症環境下における食事性セリンの役割の解明を試みた。コントロール食 (Ctrl) およびセリン欠乏食 (SDD) を SPF 環境下の C57BL/6 マウスに 3 日間投与し、その後デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 投与によって腸炎を誘導し、腸炎の重症度を評価した。その結果、DSS 非投与群では、体重減少や大腸の病理スコアは、Ctrl 群と SDD 食群で有意な差は見られなかった (図 2)。しかしながら、DSS 投与群では Ctrl 食群に比べ SDD 群で、体重減少および病理スコアが有意に悪化した。これらの結果から、食事性セリンは腸炎を抑制するために重要なアミノ酸であることが示された。



次に、食事性セリンが宿主細胞と腸内細菌のどちらに重要なのかを明らかにするために、腸内細菌を存在しない無菌マウスを用いて実験を行った。上記の実験と同様に、コントロール食あるいはSDD を無菌マウスに投与し、その後 DSS 投与により腸炎を誘導した。その結果、Ctrl 群と SDD 群で病理スコアに有意な差は見られなかった (図 3)。これらの結果から、食事性セリン制限は、腸内細菌を介して腸炎を悪化させていることが示された。



次に炎症環境および食事性セリン制限下における腸内細菌の変化を評価するために、糞便中の腸内細菌を 16S rRNA シーケンスで解析した。その結果、DSS 非投与では食事性セリン制限により腸内細菌の大きな変化は見られなかったが、DSS 投与群ではセリン制限により腸内細菌の構成が大きく変化していることが示された (図 4A)。統計的に有意に変化している腸内細菌群を評価するために Linear discriminant analysis Effect Size (LEfSe) を行った結果、*Verrucomicrobiaceae* および *Enterobacteriaceae* が SDD 群で有意に増加していた (図 4B)。これらの腸内細菌を詳細に解析するために特定のプライマーを用いて qPCR を行った結果、*Akkermansia muciniphila* および *Escherichia coli* が SDD 群で有意に増加していることを確認した。



A. muciniphila はムチン分解細菌としてヒトの腸内にも存在しており、IL-10 欠損マウスやサルモネラ感染マウスの腸炎を悪化させることが報告されている (Seregin et al. Cell Rep. 2017, Ganesh et al. PLoS One. 2013)。さらに、最近のノトバイオートマウスを用いた研究により、食物繊維が含まれない食事を投与すると、*A. muciniphila* を含むムチン分解細菌が顕著に増加し、腸管粘液バリアを傷害することによって、*Citrobacter rodentium* 感染の腸炎を悪化させることが明らかにされている。興味深いことに、腸管粘液の主成分であるムチンには、スレオニンやプロリンといったアミノ酸に加え、セリンも豊富に含まれている。これらの背景から、腸炎環境下およびセリン制限下では、腸管ムチンからセリンを得るために *A. muciniphila* がムチンを分解し、その結果、腸炎の感受性が増加しているのではないかと考えられた。これらの仮説を検証するために、炎症環境および

セリン制限下における腸管粘液バリア機能を評価した。

大腸のパラフィン切片をアルシアンブルー/PASにより染色し、大腸ムチン層の厚さを評価した。その結果、DSS 非投与群では食事性セリン制限の影響は見られなかったが、DSS 投与後は Ctrl 群に比べ SDD 群で有意にムチン層の厚さが減少した (図 5A、5B)。また、このムチン層の減少と同様に、SDD 群では FITC-dextran の腸管透過性およびバクテリアルトランスロケーションが有意に増加していた (図 5C、5D)。これらの結果から、腸炎環境下における食事性セリンの制限は、腸管粘液バリアを障害することにより腸炎感受性を増加している可能性が示唆された。

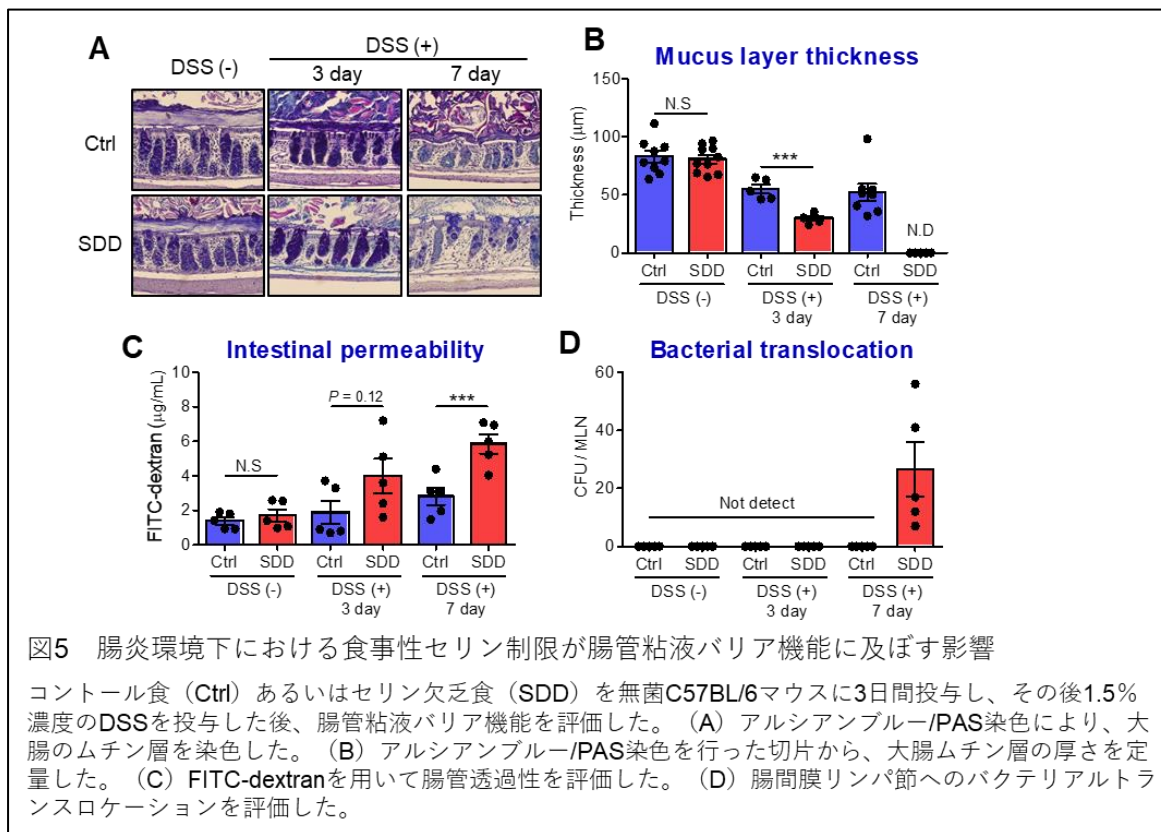


図5 腸炎環境下における食事性セリン制限が腸管粘液バリア機能に及ぼす影響

コントロール食 (Ctrl) あるいはセリン欠乏食 (SDD) を無菌C57BL/6マウスに3日間投与し、その後1.5%濃度のDSSを投与した後、腸管粘液バリア機能を評価した。(A) アルシアンブルー/PAS染色により、大腸のムチン層を染色した。(B) アルシアンブルー/PAS染色を行った切片から、大腸ムチン層の厚さを定量した。(C) FITC-dextranを用いて腸管透過性を評価した。(D) 腸間膜リンパ節へのバクテリアルトランスロケーションを評価した。

以上の結果から、腸炎環境下において食事性セリンは腸管粘液バリアを維持するための重要な栄養素であることが示された。食事性セリン制限のみでは、宿主の免疫や細菌叢、腸管粘液バリアに変化が見られなかったことから、通常の代謝環境下では食事性セリンを制限しても宿主に影響はないと考えられる。しかし、腸炎環境下では宿主細胞あるいは腸内細菌の栄養代謝が変化しているため、食事性セリンの要求性が増加することが考えられた。食事からのセリンの供給がこのセリンの要求性を満たせない場合、腸管粘液バリア機能が破綻しバクテリアルトランスロケーションが増加することによって腸炎が悪化することが示唆された。これらの成果は、腸炎環境という特殊な状況における宿主-腸内細菌の相互作用を明らかにしたものであり、今後のIBDの栄養療法を考える上で非常に重要な成果であると考えられた。

■成果の発表・関係学会への参加状況

これらの研究成果は、2019年5月に開催された Digestive Disease Week 2019 で口頭プレゼンテーションにより発表した (様式10-別紙1)。

■謝辞

最後に留学をご支援いただいた日本学術振興会の皆様に心より感謝を申し上げます。また、本研究を実施するにあたって、ご協力・ご支援を頂いた鎌田博士を始め、鎌田ラボの皆様に厚く御礼申し上げます。